

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：26201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590258

研究課題名(和文)血管形成におけるFOXO1の機能解析

研究課題名(英文)Function of FOXO1 in the retinal vascular formation

研究代表者

古山 達雄(Furuyama, Tatsuo)

香川県立保健医療大学・教養部・教授

研究者番号：20238702

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：血管形成に関与する多くの遺伝子の一つであるFOXO1を血管内皮特異的に欠損させたマウスモデルを用いて、生後に血管形成過程が進行する網膜血管に異常が生じるかを検討した。その結果、血管の伸長抑制、分岐点の増加、tip細胞数の増加などの異常がおこることが分かった。FOXO1蛋白はすべての血管内皮細胞に発現しているが、その細胞内局在を見るとstalk細胞や多くのtip細胞では細胞質に、また一部のtip細胞や毛細血管部分では主に核に局在しており、部位により大きく異なることからFOXO1は血管形成過程にある血管内皮細胞において部位ごとに異なる機能を持つ可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：FOXO1 is a transcription factor known to be involved in vascular formation during embryonic development. We examined whether the deficiency of FOXO1 in the endothelial cells affected the vascular formation in the retina during postnatal development. In the FOXO1-deficient retina, the spread of vascular network from the center of the retina was significantly reduced, the branching points of blood vessels and the number of tip cells were significantly increased compared to the control. Although FOXO1 was expressed in all endothelial cells, it was dominantly localized in the cytosol of stalk cells and some of tip cells and in the nuclei of some of tip cells and the endothelial cells of a capillary vessel in the vascular plexus. The localization of FOXO1 to the cytosol in the tip cells was partially regulated through the phosphorylation by Akt. Taken together, it is suggested that FOXO1 may play a different role in between regions of vessels during vascular formation.

研究分野：解剖学・形態形成学

キーワード：血管形成 網膜

## 1. 研究開始当初の背景

発達過程において、また腫瘍や糖尿病性網膜症などさまざまな疾患の進行過程において、血管形成は酸素・栄養素等の輸送を介して成長・分化・増殖などに重要な役割を果たしている。これまでの多くの研究により血管形成過程に関わる実に多くの分子の実態が明らかにされてきた。われわれはこれまでインシュリンシグナル経路の下流に位置し、老化、酸化ストレス、エネルギー代謝、細胞周期、アポトーシスなど多彩な生理機能に関与することが明らかになってきた FoxO 転写因子ファミリーの一つである FoxO1 について、その欠損マウスの作成を通して機能解析を行ってきた。通常の FoxO1 欠損マウスは血管形成異常により胎生 11 日ごろまでに胎生致死となることから発達過程における血管形成に必須である。一方で生後におこってくる血管形成や、疾患に伴う血管形成などへの関与の詳細は十分には明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

本研究では生後に発達してくる網膜の血管形成過程をモデルにして FoxO1 の血管形成過程において FoxO1 がどのような関与をしているかを明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 血管内皮特異的 FoxO1 欠損マウスの作成

Tie2Cre-ER-FOXO1<sup>flox/flox</sup> マウスを用いて血管内皮特異的に FoxO1 を欠損させるため、生後 1, 3, 5 日に胃内に 0.4mg のタモキシフェンを投与し、生後 6 日目に網膜の回収を行った。

コントロールとして同様の処理をした Tie2Cre-ER-FOXO1<sup>flox/+</sup>(FoxO1<sup>+/-</sup>) マウスを Tie2Cre-ER-FOXO1<sup>flox/flox</sup>(FoxO1<sup>-/-</sup>) と比較

した。

## (2) 免疫染色

マウスから網膜を取り出し 2%パラホルムアルデヒド(PFA)で5分間固定後メタノールにて-30℃で保存した。保存した網膜を室温にて4%PFAで5分間再固定しブロッキング反応後次の一次抗体またはlectinを4℃で一晩反応させた。抗PECAM-1抗体(Millipore)、抗FOXO1抗体、抗pAkt(S473)抗体、抗pAkt(T308)抗体(CST)またはFITC標識-GS-lectin(Vector)を用いた。その後PBSにてwash後それぞれに対応してAlexa647標識-抗rat IgG抗体(Jackson)、HRP標識-抗rabbit IgG抗体(CST)、ABCキット(Vector)、TSA-DNPキット、TSA-Cy3キット(Perkin)、Alexa488標識-抗DNP抗体(Invitrogen)を用いて検出した。再度PBSにてwash後DAPI(Sigma)含有50%グリセロールにて封入し蛍光顕微鏡(オリンパス)にて観察、記録した。

## (3) DNA アレイ実験

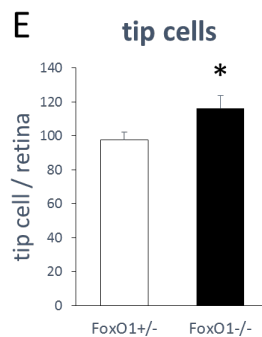
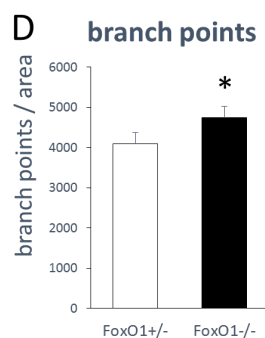
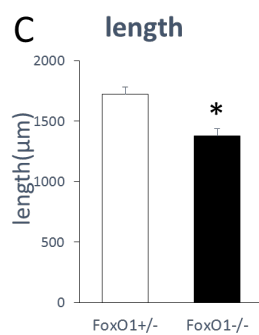
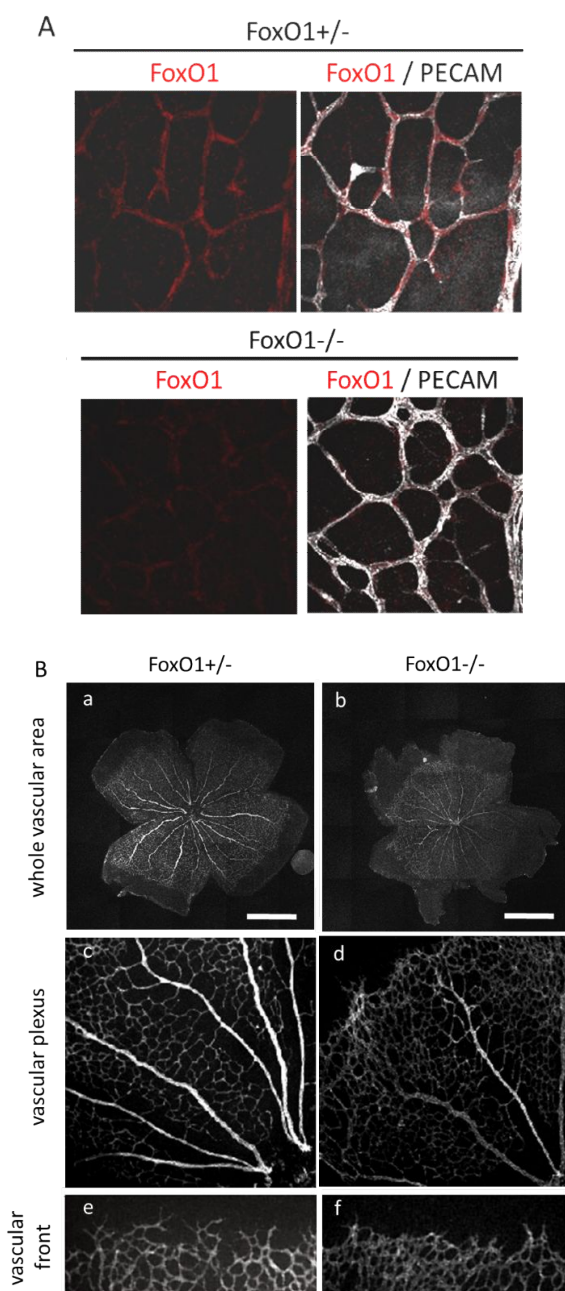
(1)で作成したマウス各5匹より網膜を取り出しプールした後、RNA抽出キット(Invitrogen)を用いてRNAを抽出した。これを用いてAgilent G3 gene expression 8x60k arrayにて1色法によるDNAマイクロアレイ受託解析(タカラバイオ)を行った。

## 4. 研究の成果

(1)血管内皮特異的 FoxO1 欠損マウス網膜血管における形態変化異常

最初に FoxO1<sup>-/-</sup>マウスの FoxO1 の発現量の低下を免疫染色にて確認したところ毛細血管部、先端部、動静脈において FoxO1 の低下が確認できた(Fig1-A)。つづいて視神経乳頭からの血管の伸長距離を計測し比較したところ FoxO1<sup>-/-</sup>マウスではコントロールに比べ有意に伸長が低下していた(Fig1-Ba,b, C)。さら

に網膜あたりの総血管分岐数は FoxO1<sup>-/-</sup> マウスで有意に増加していた(Fig1-Bc,d, D)。また網膜あたりの tip 細胞数を計測したところ FoxO1<sup>-/-</sup> マウスで有意に増加していた(Fig1-Be,f, E)。以上のことから FoxO1 は生後に発達してくる網膜の血管形成においても、血管の伸長、分岐点の制御、tip 細胞数の制御に関与していることが示された。



\* : p<0.05

Fig1 FoxO1 欠損網膜における形態異常

(2) 網膜血管内皮細胞における FoxO1 の細胞内局在

Fig1-A にも示すように FoxO1 は、stalk 細胞、tip 細胞、動静脈、毛細血管部の内皮細胞にひろく局在していた。tip 細胞では核内に局在するものと細胞質に局在するものが両方見られ、stalk 細胞では細胞質のみにほぼ認められた。この局在の違いは tip 細胞に発現する遺伝子が stalk 細胞では発現抑制される可能性を示す。FoxO1 の局在は Akt によるリン酸化により制御されていることはよく知られているため、そこで pAkt の免疫蛍光染色を行った。

Akt は Thr308、Ser473 の 2 か所が順にリン酸化されることで完全活性型(pAkt(Ser473))となり FoxO1 をリン酸化する。P6 の網膜において pAkt(Thr308)、pAkt(Ser473)共に先端部で強く認められ、それ以外の領域では弱い発現を示した (Fig2-A, B)。また pAkt(Thr308)はほとんどすべての血管内皮細胞および周辺細胞で検出できた(Fig2-A 上段)が pAkt(Ser473)は先端部のごく限られた tip 細胞に局限していた(Fig.2B 上段)。

次に tip 細胞における pAkt(Ser473)と FoxO1 との関連性をみるために 2 重染色を行った。pAkt(Ser473)の活性が認められる tip 細胞では FoxO1 は核外に移行している様子が観察された(Fig2.C)。

以上のことから pAkt シグナルは新生血管の先端部で主に活性化しており、一部の tip 細胞では完全活性型となり pAkt が FoxO1 の細胞質局在を誘導している可能性が高い。しかし stalk 細胞などでは FoxO1 の局在に Akt 以外の因子がより大きな関与をしていることが示唆された。さらに FoxO1 は形成されつつある血管の部位によって細胞内局在が異なっていることから、先端部の内皮細胞における

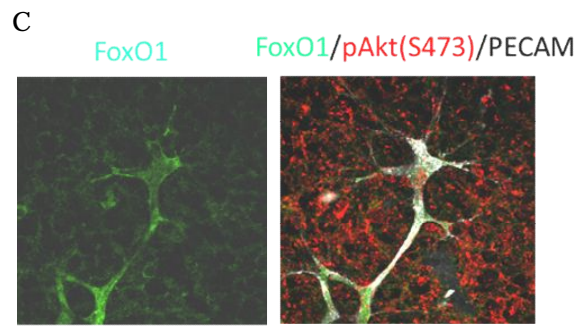
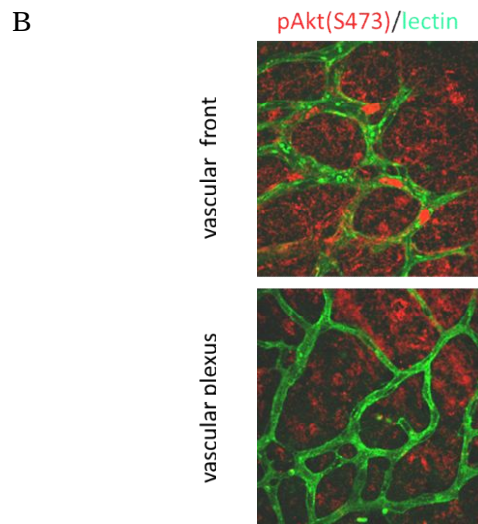
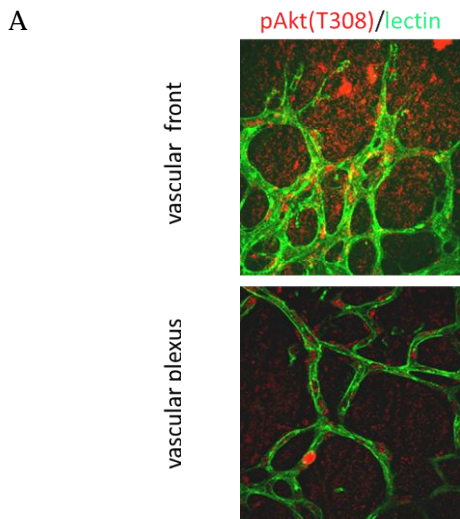


Fig2 FoxO1 の細胞内局在と pAkt の関与

機能と、毛細血管部の内皮細胞においては異なる機能を担っている可能性が示唆された。

### (3) FoxO1 欠損網膜における遺伝子発現変化

これまでに HUVEC 細胞において siRNA を用いて FoxO1 を発現抑制することにより発現変動を示す遺伝子について検討した報告はすでに存在する。しかし(2)に示すように FoxO1 の発現は血管の部位によってさまざまな細胞内局在変化を示すことから均一な細胞を用いた解析には限界があると考えられる。そのため網膜の血管内皮全体で FoxO1 を欠損することにより発現変動する遺伝子の有無を DNA アレイにより検討した。すでに FoxO1 欠損した HUVEC で報告されている Ang2 や PDGF-B のような tip 細胞に比較的局在し

ている遺伝子の発現低下は検出できなかった。しかしこれまでに報告されていない遺伝子の発現変動が認められた。この中には細胞周期、細胞増殖因子、神経系に關与するとされる遺伝子など多岐にわたって存在しており、(2)から推測されるように血管の部位ごとに異なる遺伝子を調節している可能性を支持するものであった。今後これらの遺伝子の発現変動の確認と、発現細胞の同定、血管の形態異常との關連を明らかにしていく予定である。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

Miyazaki S, Minamida R, Furuyama T, Tashiro F, Yamato E, Inagaki S, Miyazaki J.

Analysis of Foxo1-regulated genes using Foxo1-deficient pancreatic  $\beta$  cells.

Genes Cells. 2012 (9):758-767. doi:

10.1111/j.1365-2443, 査読あり

[学会発表] (計3件)

Fukumoto Moe, Ueda Shinnnosuke, Uni Kazumasa, Furuyama Tatsuo, Inagaki Shinobu Effects of FoxO1 on angiogenesis in the retina 第120回日本解剖学会 2015年3月22日 兵庫県・神戸市

Yasunaga Masayuki, Moriguchi Disuke, Kido Keisuke, Inagaki Shinobu, Furuyama Tatsuo Altered localization of FoxO1 in neuron by methamphetamine 第120回日本解剖学会 2015年3月23日 兵庫県・神戸市

宇仁和将、香原美咲、福本萌、植田進之介、古山達雄、稲垣忍 糖尿病マウス血管内皮細胞におけるFoxO1の機能 第118回日本解剖学会 2013年3月29日 香川県・高松市

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

古山 達雄 (Furuyama, Tatsuo)

香川県立医療大学・教養部・教授

研究者番号：20238702

(2) 研究分担者

稲垣 忍 (Inagaki, Shinobu)

大阪大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：90151571

(3) 研究協力者

福本 萌 (Fukumoto, Moe)

宇仁 和将 (Uni, Kazumasa)

香原 美咲 (Kouhara, Misaki)